

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590538

研究課題名(和文) 新たな手法によるパラミクソウイルス媒介膜融合の分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the paramyxovirus-mediated membrane fusion as analyzed by novel procedures for detection

研究代表者

鶴留 雅人 (Tsurudome, Masato)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50159042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：パラインフルエンザ5型ウイルスとシミアンウイルス41のF蛋白のキメラ解析により、F蛋白頭部表面の5つのドメインに属する21個のアミノ酸がHN蛋白のストーク領域との機能的相互作用を媒介することにより、細胞融合が誘導されることを明らかにした。さらに、この機能的相互作用はHN蛋白のストーク領域の立体構造に依存することが示唆された。

一方、二分子蛍光相補性法による解析により、細胞融合融合にともなうHN蛋白とF蛋白の物理的相互作用はF蛋白の解裂だけではなく構造変化にも依存していることが明らかになったが、生理的条件下ではその親和性が弱いか、あるいは極めて短時間しか生じないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chimeric analysis of the F proteins of the parainfluenza virus 5 and simian virus 41 revealed that 21 amino acids in the five domains on the surface of the F protein head region are involved in functional interaction with the HN protein stalk region, leading to the induction of cell-cell fusion. Furthermore, it was suggested that this functional interaction is dependent on the conformation of the HN stalk region.

On the other hand, the results obtained from bimolecular fluorescence complementation analysis indicated that physical interaction between HN and F protein is not only dependent on the proteolytic cleavage of the F protein but also on the conformational change of the F protein. However, it was suggested that under physiological conditions his physical interaction is weak in its avidity or takes place very transiently.

研究分野：ウイルス学・分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：パラインフルエンザウイルス HN蛋白 F蛋白 分子間相互作用 膜融合

1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス亜科に属するウイルスはそのエンベロープに2種類の糖蛋白、すなわち受容体結合蛋白(HN, H, あるいはG: ウイルスの属によって名称が異なる)と膜融合蛋白(F)を持っており、細胞に感染する際には、まず受容体結合蛋白を介して細胞に結合し、次にF蛋白が構造変化を起こすことによってエンベロープと細胞膜とを融合させる。この膜融合はpHに依存性しないため、場合によっては感染細胞表面に発現したF蛋白は隣接する非感染細胞との膜融合(細胞融合あるいは多核巨細胞形成)を誘導し、その結果、感染の拡大と同時に細胞傷害が引き起こされる。なおF蛋白が構造変化を起こすためには、細胞由来の蛋白分解酵素により、ジスルフィド結合した2つのサブユニット(F1とF2)に解裂することが前提となる。

かつては、受容体結合蛋白の役割は受容体へ結合することだけであり、膜融合はF蛋白単独で誘導されると考えられていた。しかし、私たちおよび国内外の複数の研究グループにより、膜融合の誘導には「**受容体結合蛋白とF蛋白の相互作用**」が必要であることが立証された。これは、1種類のエンベロープ蛋白が受容体結合能と膜融合誘導能を具有している他の大部分のエンベロープウイルスとは対照をなす、パラミクソウイルスに特徴的な膜融合誘導機構である。また私たちは、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(HPIV2)とシミアンウイルス41(SV41)の受容体結合蛋白(HN)のキメラ解析を行い、HN蛋白のストーク(茎)領域がF蛋白との相互作用に関与することを見出したが、時を同じくして米国の2つの研究グループが、HPIV3、センダイウイルス(SeV)、およびニューカッスル病ウイルス(NDV)のHN蛋白についても同様の結果を報告した。近年では、麻疹ウイルスのH蛋白やニパウイルスのG蛋白についても、そのストーク領域の関与が指摘されている。またX線結晶構造解析により、パラインフルエンザ5型ウイルス(PIV5)、NDV、およびHPIV3のHN蛋白の頭部領域の立体構造が解明され、受容体結合部の位置も同定されたが、ストーク領域の立体構造は不明であり、この領域がどのような様式でF蛋白と相互作用するのかは謎である。一方、F蛋白については、その頭部領域の二つのドメイン(M1とM2)がHN蛋白との相互作用に関わっていることを私たちは見出している。

2. 研究の目的

他のエンベロープウイルスと同様、パラミクソウイルスによる膜融合についての研究も近年急速に進展しているが、その分子機構については解明すべき多くの課題が残されている。そのうちで最も重要な課題のひとつはHN蛋白とF蛋白との相互作用に関するものであり、少なくとも2つのモデルが提唱されている。第1のモデルでは、エンベロープあるいは感染細胞表面のHN蛋白が標的膜表面の受容体に結合することによってHN蛋白とF蛋白との一時的な相互作用が起こり、この相互作用がF蛋白を活性化して膜融合を誘導するとされている。一方第2のモデルではHN蛋白とF蛋白の複合体が受容体結合前にすでに形成されており、F蛋白は受容体結合によってこのHN-F複合体から乖離して活性化し、膜融合を誘導するとされている。前述の2つのモデルの根拠とされている実験は、通常の蛋白-蛋白複合体の検出に用いられる免疫共沈(Coimmunoprecipitation: Co-IP)法によるものであり、HN蛋白とF蛋白を発現させた細胞を界面活性剤で可溶化する必要があるが、ウイルスあるいは研究機関によってその結果が異なる場合がある。この不一致の原因は不明であるが、膜貫通蛋白であり、しかも構造的に極めて不安定であるF蛋白を界面活性剤で処理すると、その立体構造が大きく変化することを私たちは見いだしている。すなわちCo-IP法がHN-F複合体の検出に適していないことが、実験結果の不一致の一因である可能性が高いと私たちは考えている。したがって本研究では、「**HN蛋白とF蛋白の結合を検出するための適切な実験系が確立されていない**」ことに着目し、より適した複数の検出系を用いることによって、HN-F相互作用を解析し、パラミクソウイルスによる膜融合の分子機構を解明することをその目的としている。以上の研究により、パラミクソウイルスの受容体結合蛋白とF蛋白の相互作用による膜融合の分子機構が体系的に解明されるとともに、エンベロープウイルスによる膜融合の研究領域にパラダイムシフトがもたらされることが期待される。さらに、本研究で得られる知見は、複数の蛋白の相互作用によって制御されている各種の生理的細胞融合(受精、筋形成、破骨細胞形成など)の分子機構を解明する上でも、有意義なものとなることが予想される。

3. 研究の方法

(1) PIV5 と SV41 のキメラ F 蛋白の作製

これまでの研究によって HN 蛋白との相互作用に関わっていることが想定されている PIV5 の F 蛋白の5つのドメイン (M1, M2, M3, M4, および B) 内のアミノ酸を SV41 の F 蛋白の対応アミノ酸で置き換えた種々のキメラ蛋白を作製し, SV41 の HN 蛋白と共に BHK 細胞に発現させて細胞融合を誘導するかどうかを調べることにより, HN 蛋白との相互作用に関わるアミノ酸を同定する。

(2) Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) による HN-F 相互作用の解析

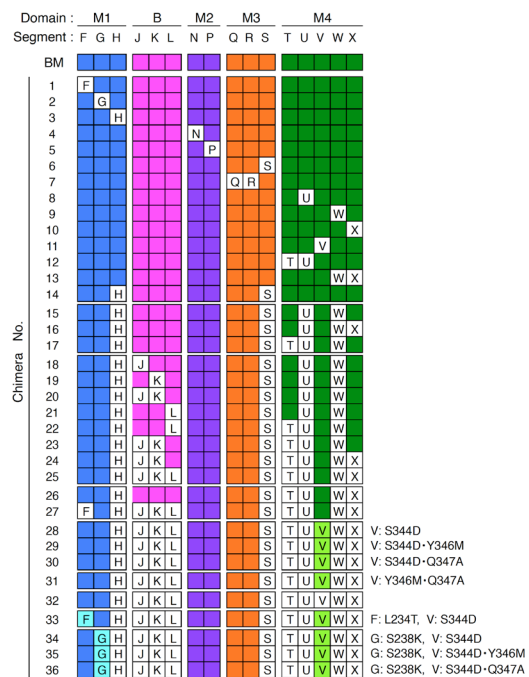
Yellow fluorescent protein (YFP) は, N 末側断片 (Yn) と C 末側断片 (Yc) に分割すると蛍光を発しないが, これらの断片が近接すると YFP の再構成が起こり, 蛍光を発するようになる。従って, Yn と Yc をそれぞれ HN 蛋白の細胞質内領域 (N 末端) と F 蛋白の細胞質内領域 (C 末端) に付加したものをほ乳類細胞に発現させると, HN-F 複合体が形成されると同時に YFP の再構成が起こり, 蛍光が検出されることが期待できる。ただし, F 蛋白は発現細胞表面に到達する前に TGN 内の Furin 様蛋白分解酵素によって解裂してしまうので, 本研究では F 蛋白の解裂配列をトリプシン解裂型に改変した変異蛋白も作製する。

(3) Residue-specific photo-crosslink (RSPC) による HN-F 相互作用の解析

近年になってようやく, 哺乳類細胞の膜蛋白同士の相互作用を調べる手法として, Residue-specific photo-crosslink (RSPC) 法が実用化された。また, この RSPC に用いられる, 光架橋性を持つ2種類のアミノ酸アナログ (L-photo-Met と L-photo-Leu) が市販されるようになった (Thermo Scientific)。① HN 蛋白と F 蛋白を共発現させた BHK 細胞に 1 mM の L-photo-Met と L-photo-Leu を添加することにより, これらのアミノ酸を代謝的に合成中の蛋白に取り込ませる。② 光架橋性を持つアミノ酸を添加した細胞に紫外線 (350 nm) を一瞬間照射した後, 界面活性剤を用いて細胞を可溶化し, 抗 HN モノクローナル抗体を用いた免疫共沈法, SDS-PAGE, さらに抗 F モノクローナル抗体を用いた Western Blot 法により, HN-F 複合体を検出する。最後に, BiFC 法と RSPC 法で得られた結果を比較検討することによって, HN-F 相互作用の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

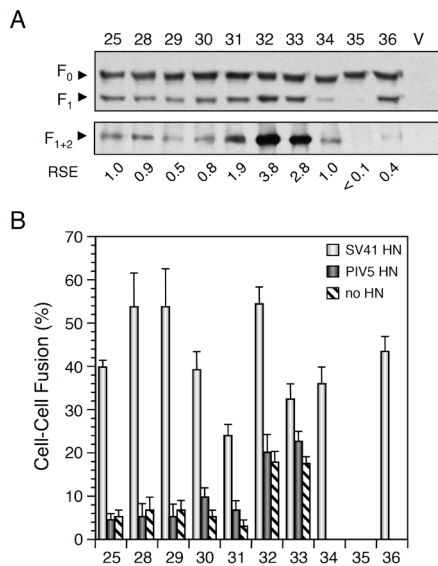
(1) HeLa 細胞における蛋白発現系において, PIV5 の F 蛋白の5つのドメイン (B, M1, M2, M3, M4) を SV41 の F 蛋白の相同ドメインで置換したキメラ F 蛋白は, SV41 の HN 蛋白と共発現させると膜融合を誘導できるが, PIV5 の HN 蛋白との共発現では膜融合を誘導できないことを明らかにした。この5つのドメイン内には SV41 の F 蛋白由来のアミノ酸が 41 個含まれていたため, それぞれのドメインおよびアミノ酸の重要性を調べるために, 36 個のキメラ F 蛋白を作製した (図1)。



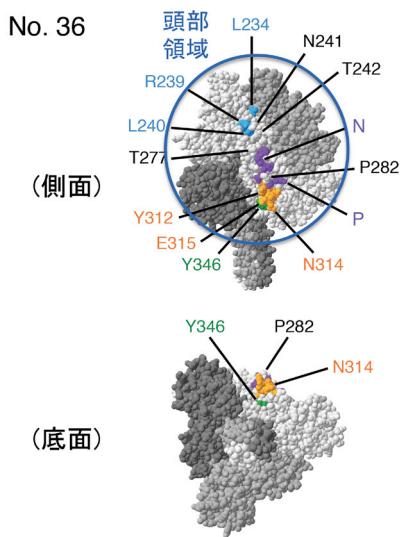
(図1)

これらのキメラ F 蛋白と各種 HN 蛋白を BHK 細胞に共発現させて, 細胞融合誘導の有無を調べた結果, PIV5 の F 蛋白のドメイン M1, M2, M3 および M4 に属する21個のアミノ酸を SV41 の F 蛋白の対応アミノ酸で置換したキメラ F 蛋白 (No.36) が, SV41 の HN 蛋白と機能的相互作用して細胞融合を誘導する能力を獲得すると同時に, PIV5 の HN 蛋白と機能的に相互作用する能力を失っていることを見出した (図2)。一方, PIV5 の F 蛋白はムンプスウイルス (MuV) の HN 蛋白とも機能的相互作用できることを既に報告しているが, 興味深いことに, 上記の変異 F 蛋白はこの能力を保持していることが判明した。以上の結果から F 蛋白の頭部側面に位置する21個のアミノ酸群 (図3) が HN 蛋白との相互作用に関わっていることが明らかになった。

一方, HN 蛋白に関しては, 頭部ではなくストーク領域が F 蛋白との機能的相互作用



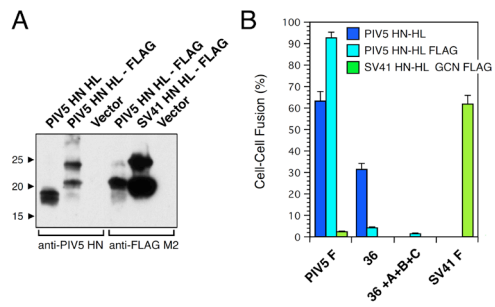
(図2)



(図3)

用に関与していると考えられている。そこで、SV41のHN蛋白の頭部を欠損させた短縮型HN蛋白にFLAGタグを付加したもの(SV41HN-HL FLAG)を作製し、その細胞融合促進能を解析したところ、PIV5のF蛋白とではなくSV41HNのF蛋白と機能的相互作用して細胞融合を誘導したが、予想に反して上記No.36との機能的相互作用は認められなかった(図4)。また、SV41のHN蛋白の頭部を欠損させた短縮型HN蛋白にFLAGタグを付加したもの(PIV5HN-HL FLAG)を発現させた場合には、SV41HNのF蛋白とではなく、PIV5のF蛋白と機能的相互作用して細胞融合を誘導し、予想どおりNo.36との機能的相互作用は認められなかった。しかし興味深いことに、PIV5HN-STの

FLAGタグを除くと、No.36との機能的相互作用が認められるようになった(図4)。

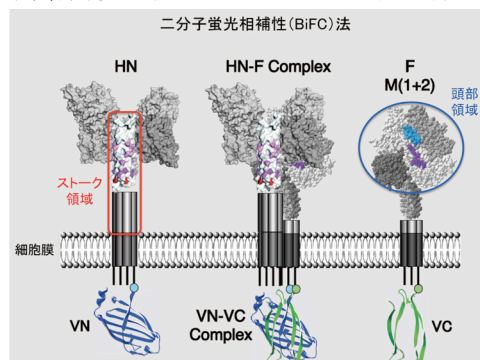


(図4)

SV41のHN蛋白のストーク領域とヒトパラインフルエンザウイルス2型(hPIV2)の頭部領域をもつキメラHN蛋白は、hPIV2のF蛋白とではなくSV41HNのF蛋白と機能的相互作用して細胞融合を誘導したが、上記キメラF蛋白(No.36)との機能的相互作用は認められなかった。

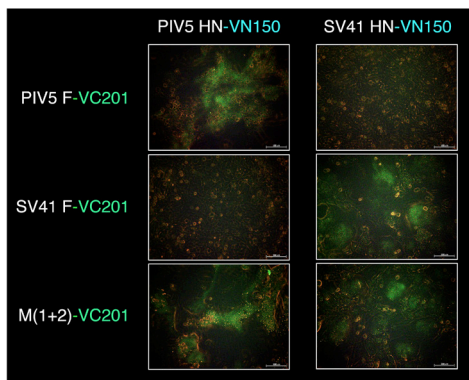
以上の結果から、HN蛋白のストーク領域のみでなく頭部領域もF蛋白と機能的相互作用に関わっていること、また、この頭部領域がストーク領域の立体構造あるいは可塑性に影響を与えることにより、F蛋白と機能的相互作用を制御していることが示唆された。

(2) BiFC法を用いて、HN蛋白とF蛋白の物理的相互作用を解析するために、PIV5あるいはSV41のF蛋白およびキメラF蛋白、M(1+2)の細胞内領域に蛍光蛋白(Venus)のC末側半分を付加したものを作製した。一方、PIV5あるいはSV41のHN蛋白の細胞内領域にはVenusのN末側半分を付加したものを作製した(図5)。なお、M(1+2)はPIV5のF蛋白の二つのドメイン(M1とM2)をSV41のF蛋白の対応ドメインで置換したキメラであり、PIV5およびSV41のHN蛋白いずれも機能的に相互作用して細胞融合を誘導することを既に報告している。これら5種類の蛋白を用いて、BHK細胞における共発現系で解析したところ、37°C、12時間培養後にすべてのHN-Fの組み合わせ



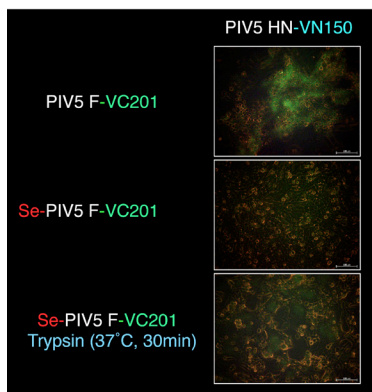
(図5)

で蛍光が認められたが、いずれの F 蛋白も系統的に遠縁である HPIV1 の HN 蛋白、あるいは細胞の膜蛋白である CD98 との共発現でも蛍光を発することが判明した。そこで、Venus の N 末側半分の150位、一方、C 末側半分の201位にアミノ酸変異を導入したものを作製して、同様の解析を行った結果、上記のような Venus の非特異性会合が見られなくなり、細胞融合の起こる組み合わせでのみ蛍光が認められた(図6)。ただし、この蛍光は37°Cでは観察されず、さらに25°Cで12時間培養しないと認められなかったことから、HN 蛋白と F 蛋白の物理的相互作用は、生理的条件下では極めて親和性が弱いこと、あるいは極めて短時間しか生じない



(図6)

ことが示唆された。また、非解裂型の PIV5 の F 蛋白は PIV5 の HN 蛋白と共発現させても細胞融合は起こらず、蛍光も認められなかったが、トリプシン処理で解裂させると細胞融合の出現とともに蛍光が認められたことから、N 蛋白



(図7)

と F 蛋白の物理的相互作用は F 蛋白の構造変化に依存していることが示唆された(図7)。

(3) 上記の知見に基づいて RSPC による HN-F 相互作用解析を行なった結果、F 蛋白のモノマー間の架橋は認められたが、HN 蛋白と F 蛋白の架橋は検出されなかった。なお今回の結果からは、架橋によって解析限界を越えた超高分子が生成し

た可能性が示唆されたことから、検出法をさらに改善する必要があると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- 1) Kihira S, Uematsu J, Ishitana Y, Chindoh M, Baba A, Kuzuta R, Hasegawa T, Fujimoto K, Funouchi A, Yamamoto H, Kawano M, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H. Calcium ionophore A23187 inhibits human parainfluenza virus type 2 growth and monoclonal antibody against CD98 heavy chain recovers the inhibition. *Int. J. Sci.* 3: 14-20. (2014) 査読有.
- 2) Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y, Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. *PLoS One* 8:e66614. (2013) 査読有.
- 3) Tsurudome M, Nakahashi M, Matsushima Y, Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Nosaka T. Full conversion of the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the parainfluenza virus 5 fusion protein by replacement of 21 amino acids in its head region with those of the simian virus 41 fusion protein. *J. Virol.* 87:8342-8350. (2013) 査読有.
- 4) Uematsu J, Koyama A, Takano S, Ura Y, Tanemura M, Kihira S, Yamamoto H, Kawano M, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H. Legume lectins inhibit human parainfluenza virus type 2 infection by interfering with the entry. *Viruses.* 4:1104-1115. (2012) 査読有.
- 5) Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nakahashi M, Kawano M, Komada H, Nosaka T, and Ito Y. Identification of domains on the fusion (F) protein trimer that influence the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the F protein in mediating cell-cell fusion. *J. Virol.* 85: 3153-3161. (2011) 査読有.
- 6) Nishio M., Tsurudome M, Garcin D, Kimada H, Ito M, Lemercier P, Nosaka T, Kolakovskiy D. Human parainfluenza virus type 2 L protein regions required for interaction with other viral proteins and mRNA capping. *J. Virol.* 85: 725-732. (2011) 査読有.

- 7) Komada H, Kawano M, Uefuji A, Ito M, Tsurudome M, Hatakeyama E, Nakanishi M, Sakue S, Joh C, Suzumura E, Tamaki T, Tomioka T, Nishio M, Tsumura H, Uematsu J, Yamamoto H, O'Brien M, Bando H, Ito Y. Completion of the full-length genome sequence of human parainfluenza virus types 4A and 4B: sequence analysis of the large protein genes and gene start, intergenic and end sequences. Arch. Virol. 156:161-166. (2011) 査読有.

[学会発表] (計 14 件)

- 1) 山本秀孝, 鎌田美有紀, 谷口弘恵, 植松 淳, 河野光雄, 鶴留雅人, 伊藤 眞, 駒田 洋. グリチルリチン酸によるパラインフルエンザウイルス2型増殖阻害. 日本薬学会第134年会, 平成26年3月28日, 熊本.
- 2) 鶴留雅人, 伊藤守弘, 西尾真智子, 河野光雄, 駒田 洋, 大塚順平, 野阪哲哉. パラインフルエンザウイルスのHN蛋白とF蛋白の機能的相互作用の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 平成25年11月12日, 神戸.
- 3) 西尾真智子, 太田圭介, 湯峯奈都子, 鶴留雅人, 五藤秀男. ヒトパラインフルエンザウイルス2型(hPIV2)のV蛋白と結合する宿主細胞蛋白AP1M1及びAP1M2がウイルス増殖に与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 平成25年11月12日, 神戸.
- 4) 伊藤守弘, 久保田弘通, 竹内 環, 鶴留雅人, 平松宏昭, 鈴木康夫, 伊藤康彦. インフルエンザウイルス感染と糖尿病の同時発症による病態解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 平成25年11月11日, 神戸.
- 5) Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T. Conversion of the parainfluenza virus 5 F protein to a simian virus 41 HN-specific protein by amino acid substitutions. XV International Conference on Negative Strand Viruses, 平成25年6月17日, Granada (Spain).
- 6) Nishio M, Ohta K, Tsurudome M, Kolakofsky D. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits activity of Caspase-1. XV International Conference on Negative Strand Viruses, 平成25年6月17日, Granada (Spain).
- 7) 紀平佐保子, 植松 淳, 山本秀孝, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋. リバビリンによるパラインフルエンザウイルス2型増殖阻害に対するニトロベンジルチオイノシン, アクチノマイシンD及びグアノシンの中和作用. 日本薬学会第133年会, 平成25年3月30日, 横浜.
- 8) 鶴留雅人, 大塚順平, 駒田洋, 河野光雄, 伊藤守弘, 野阪哲哉. パラミクソウイルスの膜融合誘導機構: 二分子蛍光相補性 (BiFC)法を用いた受容体結合蛋白と膜融合蛋白の相互作用の解析, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 平成24年11月15日, 大阪.
- 9) 山本秀孝, 紀平佐保子, 植松 淳, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋. 日本社会薬学会第31年会, 平成24年9月16日, 鈴鹿.
- 10) 山本秀孝, 伊藤 愛, 前田友里恵, 大河内愛弓, 佐藤冴美, 紀平佐保子, 植松 淳, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋. 漢方薬によるパラインフルエンザウイルス2型増殖阻害, 日本薬学会第132年会, 平成24年3月30日, 札幌.
- 11) 紀平佐保子, 大河内愛弓, 佐藤冴美, 伊藤 愛, 前田友里恵, 河野光雄, 鶴留雅人, 植松 淳, 山本秀孝, 駒田 洋. リバビリンによるパラインフルエンザウイルス2型増殖阻害. 日本薬学会第132年会, 平成24年3月29日, 札幌.
- 12) 鶴留雅人. パラミクソウイルスの膜融合誘導機構: 受容体結合蛋白と膜融合蛋白の機能的相互作用. 第153回日本獣医学会学術総会, 平成24年3月28日, 大宮.
- 13) Tsurudome M, Nakahashi M, Matsushima Y, Nishio M, Kawano M, Komada H, Nosaka T. Identification of amino acids of simian virus 41 (SV41) fusion protein that convert parainfluenza virus 5 fusion protein to a protein which specifically interacts with SV41 hemagglutinin-neuraminidase by substitution. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 平成23年9月15日, 札幌.
- 14) Nishio M, Ohtsuka J, Tsurudome M, Nosaka T, Kolakofsky D. Nucleocytoplasmic shuttling of the human parainfluenza virus type 2 P protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 平成23年9月15日, 札幌.

[図書] (計 2 件)

- 1) Tsurudome M: Parainfluenza virus entry. In "Negative Strand RNA Virus" Luo M (Ed.), 199 pages (p.35-61), World Scientific, New Jersey. (2011)
- 2) Tsurudome M, Ito Y: Rubulaviruses. In "The Springer Index of Viruses. 2nd edition" Tidna CA, Darai G (Eds.), 2088 pages (p.1143-1148), Springer, New York. (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴留 雅人 (TSURUDOME MASATO)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 50159042